

Hyperalgesia and decreased neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats

著者	佐々木 禎治
発行年	1998-03-24
その他の言語のタイトル	糖尿病ラットにおける痛覚過敏と神経型一酸化窒素合成酵素の減少 トウニョウビョウ ラット ニ オケル ツウカク カ ビン ト シンケイガタ イッサンカ チッソ ゴウセ イ コウソ ノ ゲンショウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/2483

氏名・(本籍)	佐々木 禎 治 (岡山県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第278号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	Hyperalgesia and decreased neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats (糖尿病ラットにおける痛覚過敏と神経型一酸化窒素合成酵素の減少)
審査委員	主査 教授 野 坂 修 一 副査 教授 戸 田 昇 副査 教授 吉 川 隆 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

糖尿病性神経障害は最も頻度の高い末梢神経障害の一つであり、痛覚過敏・知覚鈍麻など種々の知覚異常を認めることが多い。しかし、これらの異常の機序に関しては不明な点が多いが、後根神経節(DRG)ニューロンの障害も関与していることが示唆されている。一方、DRGニューロンにおいても神経系特有の一酸化窒素合成酵素(nNOS)が同定され、痛みの情報伝達・制御との関係や、サブスタンスPなどの神経ペプチドの神経末端での放出への関与などが示唆されている。そこで我々は、末梢神経系でのnNOSの動態を検討すると共に、糖尿病性神経障害におけるnNOSの動態と意義を検討するために、実験的糖尿病ラットのDRGニューロンのnNOS発現とNOの侵害受容閾値への関与について検討を行った。

【方 法】

- (1) 実験動物の作製：8週齢のSprague-Dawleyラットを用いて検討を行い、正常ラットを対照(C)群とした。糖尿病(DM)群はストレプトゾシン(STZ) 50 mg/kgを静注して作製した。インスリン治療(I)群はSTZ静注3日後、高血糖(300 mg/dl以上)を確認し、インスリンペレット(Linplant, Canada)を皮下に埋め込み作製した。
- (2) 侵害受容刺激試験：Analgesy-Meter (Ugo-Basile, Italy)を用いて、ラット後肢のフットパッドに円錐型の圧力針にて一定割合で加圧し、ラットが回避反応を示した点を侵害受容閾値とした。この検査をSTZ静注後より2週おきに12週まで経時的に行った。また、NOと侵害受容閾値との関係を検討するために、8週齢正常ラットにNOS阻害薬であるL-NAME (100 mg/kg)を静注し侵害受容閾値の検討を行った。
- (3) 組織学的検討：ラット後肢のフットパッドに分布しているDRGニューロンがnNOSを発現しているかを検討するため、8週齢正常ラットのフットパッドに逆行性神経トレーサーであるTrue Blueを皮下注し、1週後還流固定し組織学的検討を行った。組織学的検討は、STZ静注12週後パラホルムアルデヒドにて還流固定を行い、右L5 DRGを取り出し15%蔗糖溶液中に保存した。その後、クリオスタットにて厚さ20mmの凍結切片を作成し、NADPH-diaphorase染色を行った。これを写真撮影し、IBAS-1 (Contron, Germany)にて各ニューロンの面積を計測しヒストグラムを作成した。
- (4) 生化学的検討：各群のラットを断頭脱血後、両側のL4、L5、L6のDRG計6個を取り出し、蛋白定量後、Immunoblot法にてnNOS蛋白量の定量を行い、各群で比較検討を行った。また、別群のラットのDRGを用いて、RIA法にてcGMP含量を測定した。

【結 果】

- (1) STZ静注4週後よりC群に比較してDM群では有意な侵害受容閾値の低下を認めたが、I群では低下を認めなかった。

- (2) L-NAMEは正常ラットの侵害受容閾値を低下させた。
- (3) NADPH-diaphorase陽性細胞は主に小径ニューロンであり、これらの細胞の一部でTrue Blueとの二重染色を認めた。
- (4) DRGニューロン数および分布は、C群、DM群、およびI群間で差は認められなかったが、nNOS陽性ニューロンのDRGニューロンに占める割合は、C群と比較して、DM群で有意な減少が認められ、I群では正常化した。
- (5) DRGのnNOS蛋白量は、DM群でC群に比較して有意な低下を認め、I群では低下は改善された。
- (6) DRGのcGMP含量はDM群でC群に比較して有意な低下が認められたが、I群では低下の改善が認められた。

【考 察】

今回の検討により、DMおよびL-NAME投与ラットの侵害受容閾値低下の原因としてNO産生低下が関与している可能性が示唆された。NOは可溶性guanylyl cyclaseを活性化し、cGMP・PKGを介して生理作用を示す。DRGでNOがオートクリンに作用することが報告されており、DRGのnNOS発現ニューロンがフットパッドの皮膚に分布していることを考え合わせると、DMラットでは、PKGの基質の一つであるカルシウム・チャネルの機能障害をきたし後肢の侵害受容閾値が低下している可能性が考えられた。一方、坐骨神経切断やホルマリンなどの化学物質により惹起される神経障害のモデルでは、過剰NOが侵害受容閾値低下の原因であることが示唆されていることから、NOが神経障害の病態により異なった作用を有している可能性が示唆された。

一般に糖尿病性神経障害の成因として、血流障害とともに高血糖に伴う代謝異常が考えられている。後者において Na^+/K^+ -ATPase活性の低下は主要な成因の一つと考えられている。一方、NOが内皮細胞の Na^+/K^+ -ATPase活性を増強することが示されており、NO-cGMP系の障害は、侵害受容閾値低下だけでなく糖尿病性神経障害における神経機能障害の病態に関与している可能性が考慮される。

【結 論】

糖尿病性神経障害の侵害受容閾値低下にDRGニューロンのnNOS発現減少に伴うNO-cGMP系の障害が関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病性神経障害の痛覚過敏における一酸化窒素の関与を明らかにする目的で、実験的糖尿病(DM)ラットの侵害受容閾値測定を行うとともに、後根神経節ニューロンの神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)およびcyclic GMPの変化を組織学的・生化学的に検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 侵害受容刺激試験にて、DMラットおよびNOS阻害薬投与ラットで痛覚過敏が認められた。
- 2) 侵害受容刺激部の皮膚を支配するNADPH diaphorase陽性の小径ニューロンを後根神経節に認めた。
- 3) DMラット後根神経節のNADPH diaphorase陽性ニューロン数は減少していた。
- 4) DMラット後根神経節のnNOS蛋白量およびcyclic GMP含量は低下していた。
- 5) DMラットに認められた上記の異常は、インスリン治療により阻止された。

以上の研究は、糖尿病性神経障害の発症機序、病態および治療法を考察する上で重要な意味を持つものであり、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。